

心血管疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000599

ERK1/2 在 H₂S 后处理缺氧复氧心肌细胞中的表达及意义

张立羽, 杨双强

(重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)在硫化氢后处理缺氧复氧心肌细胞中的表达及意义。**方法:**建立心肌细胞株 H9C2 缺氧复氧模型并进行硫化氢后处理。实验分 5 组:缺氧复氧组(H/R)、硫化氢后处理组(H₂S)、硫化氢后处理并 ERK 抑制剂组(H₂S+PD)、ERK 抑制剂组(PD)和对照组(Control)。各组心肌细胞使用 real-time PCR 检测 ERK1/2 mRNA 的表达, Western blot 检测细胞 ERK1/2 蛋白的表达, 细胞增殖-毒性检测法(cell counting Kit-8, CCK-8)检测细胞的增殖率, 并通过流式细胞术检测细胞凋亡率。**结果:**real-time PCR 结果显示 ERK1/2 mRNA 基因表达在 H₂S 组(1.374 ± 0.270)心肌细胞与 H/R 组(0.590 ± 0.046)、H₂S+PD 组(0.895 ± 0.106)以及 PD 组(0.211 ± 0.025)比较差异有统计学意义($F=23.000, P=0.000$); H₂S 组(1.374 ± 0.270)大鼠 H9C2 细胞 ERK1/2mRNA 出现相对明显表达($P=0.005$), 而 H₂S+PD 组(0.895 ± 0.106)较 H/R 组(0.590 ± 0.046)表达明显($P=0.027$); 同样 ERK1/2 蛋白表达在 H₂S 组(ERK1: 1.986 ± 0.184; ERK2: 1.993 ± 0.175)的心肌细胞与 H/R 组(ERK1: 1.317 ± 0.179; ERK2: 1.062 ± 0.161)、H₂S+PD 组(ERK1: 1.615 ± 0.12; ERK2: 1.328 ± 0.047)以及 PD 组(ERK1: 0.925 ± 0.42; ERK2: 0.735 ± 0.369)表达组间差异有统计学意义($F_1=5.15, P_1=0.016, F_2=5.44, P_2=0.045$); 在 CCK-8 法检测结果显示 H₂S 组的心肌细胞较其余各组增殖率明显增加; 流式细胞仪检测结果提示 H₂S 组的心肌细胞凋亡率较其余各组明显降低。**结论:**经硫化氢后处理的缺氧复氧心肌细胞 ERK mRNA 以及 ERK 蛋白表达明显上调, 增殖率明显提高, 凋亡率差异明显。可能是由于加入外源性信号因子硫化氢激活缺氧复氧心肌细胞 ERK1/2 信号转导通路, 有利于心肌细胞损伤的修复, 进而产生心肌保护作用。

【关键词】细胞外调节蛋白激酶; 硫化氢(H₂S); 缺氧复氧; H9C2 大鼠心肌细胞株

【中图分类号】R654.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-05-12

Expressions and significances of ERK1/2 in hypoxia/reoxygenation cardiomyocytes post-processed by H₂S

Zhang Liyu, Yang Shuangqiang

(Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the ERK1/2 expressions and significances in hypoxia/reoxygenation cardiomyocytes post-processed by H₂S. **Methods:** H9C2 cardiomyocytes were exposed to hypoxia/reoxygenation and then post-processed by H₂S. The cardiomyocytes were divided into five groups: hypoxia/reoxygenation group(H/R), hydrogen sulfide post-treatment group(H₂S), hydrogen sulfide post-treatment with ERK inhibitor group(H₂S+PD), ERK inhibitor group(PD) and control group(control). The expressions of ERK1/2 mRNA were detected by qPCR, and ERK1/2 protein expressions were detected by Western blot. In each group the proliferation rates of cardiomyocytes were analyzed by CCK-8, and the cell apoptosis rates were analyzed by flow cytometry. **Results:** There were significantly statistical differences in expression of ERK1/2 mRNA gene among H₂S group, H/R group, H₂S+PD group and PD group ($F=23.000, P=0.000$). ERK1/2 mRNA was over expressed in rat H9C2 cells in H₂S group ($P=0.005$), more evident in H₂S+PD group (0.895 ± 0.106) than in H/R group ($P=0.027$). There were significantly statistical differences in expression of ERK1/2 protein among H₂S group, H/R group, H₂S+PD group and PD group ($F_1=5.15, P_1=0.016, F_2=5.44, P_2=0.045$). CCK-8 assay showed that of myocardial cell proliferation was significantly increased in H₂S group than in the other groups. Flow cytometry results suggested that myocardial cell apoptosis rate was significantly lower in H₂S group than in the other groups. **Conclusion:** ERK1/2 mRNA and protein expressions of hypoxia/reoxygenation cardiomyocytes are significantly increased, with higher proliferation rate and lower apoptosis rate after H₂S

treatment. Exogenous donor H₂S could activate ERK signal pathway, further benefiting the recovery of hypoxia/reoxygenation cardiomyocytes and leading to myocardial protection.

【Key words】extracellular regulated protein kinases; H₂S; hypoxia/reoxygenation; H9C2 rat cardiomyocytes

作者简介:张立羽, Email: 872741040@qq.com,

研究方向: 心血管疾病。

通信作者:杨双强, Email: yysqiang@163.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150403.0934.020.html>

(2015-04-03)

心肌细胞短暂缺血后生存力降低是心脏外科手术中常见现象之一^[1],增加了手术的风险。如何提高心肌细胞对缺血环境的耐受,保持细胞活性是减少术后风险的重要因素。而近年来越来越多的文献表明细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases,ERK)1/2 在镜下超微结构正常心肌细胞中表达含量较高,而形态学发生变化的细胞含量则较低,提示在心肌细胞凋亡发生过程中 ERK1/2 是其中的重要通路^[2],起到关键作用。激活此通路可能会提高心肌细胞活性,而如何激活此通路是本次研究的基础。大量的学术研究表明,硫化氢保护缺血心肌作用机制不明,因此选择硫化氢信号因子作为切入点来研究心肌细胞中的 ERK1/2 表达通路^[3],观察硫化氢后处理通路中 ERK 变化在减轻细胞损伤、抑制凋亡促进存活恢复的作用^[4]。本研究对大鼠 H9C2 心肌细胞株缺氧复氧建模,并探讨经硫化氢后处理激活通路对心肌细胞生存、增殖、凋亡产生影响以期对心脏外科术后可能恢复机制明确^[5]。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本次实验使用中科院上海生研所细胞生物中心 ATCC 细胞库采购的大鼠 H9C2 心肌细胞株,胎牛血清购自 Hyclone 公司,逆转录 DNA 扩增试剂盒购自 TaKaRa 公司,细胞凋亡检测试剂盒购自江苏碧云天生物研究所,兔抗大鼠 ERK1/2 抗体购自 Cell Signaling 公司,DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司,硫化氢(sodium hydrosulfide,NaHS)购自 Vetec 公司,胰蛋白酶购自 Gibco 公司,蛋白定量试剂盒(BCA Protein Assay Kit)、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自碧云天生物研究所。

1.2 分组依据

将处于对数生长期的 H9C2 心肌细胞进行计数,在细胞密度约达 70%时置换新鲜 DMEM 培养液并分别接种于 5 组培养瓶中,同时每组备份,其后放置预置条件为 37℃、97%空气、5%CO₂ 的三气培养箱中培养。再次培养 12 h 后,消化细胞,计数,从上述 5 组培养瓶中随机抽取相同状态细胞,分别接种,5 组添加同量含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,再次培养 12 h。从上述 5 组中随机抽取 4 份细胞将培养液置换为新鲜的 DMEM 培养基(其中含 10%胎牛血清),随后置于低氧孵箱(条件为 37℃、1%空气、94%N₂、5%CO₂)缺氧 2 h 后进行模拟缺氧条件,完成后放置正常条件下模拟复氧条件,在

正常培养条件下继续培养 48 h;同时,剩余的 1 份细胞,将细胞培养液置换为新鲜含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,在正常培养条件下培养 48 h。通过预实验确定适宜硫化氢浓度为 20 μmol/L。由此得到的 4 组缺氧复氧细胞和 1 组正常细胞经硫化氢后处理即 H/R 组、H₂S 组、H₂S+PD 组、PD 组、对照组。分别处理为:缺氧复氧组(H/R)给予缺氧复氧处理,硫化氢后处理组给予缺氧复氧处理后加入 20 μmol 硫化氢,硫化氢后处理并 ERK 抑制剂组(H₂S+PD)在前一组的基础上加入 10 μmol PD98059,ERK 抑制剂组(PD)给予缺氧复氧处理后加入 10 μmol PD98059,对照组(Control)未作任何处理。5 份细胞放置培养箱培养 48 h 待用。

1.3 Real-time PCR 检测 ERK mRNA 表达

ERK1/2 序列为:ERK1/2 序列为:5'-GCCGCCGCCGC-CGCCAT-3';ERK1 上游引物:5'-TACACGCAGTTGCAGT-CATCG-3';下游引物:5'-CGCAGGATCTGGTAGAGGAAGT-3';ERK2 上游引物 5'-GGAGCTTGTGAAATACCTTGG-3';下游引物:5'-GACGCAGTGTTCCTCTCTGCTA-3' 测量 H9C2 心肌细胞株的 ERK1/2 mRNA 表达并分别提取各组总 RNA,随后反转录为 cDNA,再扩增通过:95℃预变性 5 min,95℃变性 40 s,72℃延伸 30 s-循环 35 次-延伸 15 min 退火,完成 PCR 扩增。收集上述基因扩增产物,Quantity One 分析电泳成像后的光密度值。通过计算以 ERK1/2mRNA 积分光密度(integrating optical density,IOD)值代表大鼠 ERK1/2 mRNA 的相对表达量。

1.4 Western blot 检测心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达

通过运用该技术检测并分析 H9C2 心肌细胞株 ERK1/2 信号通路蛋白表达。首先通过 BCA 法提取细胞蛋白,先后使用 8%SDS 分离凝胶,10%浓缩胶,上样 40 μg 蛋白,然后经电压 60 v,3 h 电泳再进行转膜。添加抗体用吐温-20Tris 缓冲液(Tris Buffered Saline Tween 20,TBST)2 次清洗膜去除多余的一抗及二抗,每次重复 3 次,1 次 10 min,后孵育 1 h,发光试剂盒避光显影在凝胶成像分析仪下观察条带。用 Quantity One 软件对图片进行分析胶片扫描,用 IOD 表示条带的亮度代表 ERK 蛋白的相对表达量。

1.5 CCK-8 法检测心肌细胞的增殖率

应用 CCK-8 法分别检测 6 组处理后 2、4、6 h 的 H9C2 心肌细胞的 IOD 值,在相应的时间点计数取同量细胞加等量 CCK-8 溶液 20 μl(5 mg/ml),平行 7 孔,经过 37℃摇床培养 20 min 后,运用波长设定在 450 nm 的酶标仪测定 IOD 值。细胞增殖率=(后 IOD-前 IOD)/前 IOD × 100%

1.6 流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率

收集细胞 800 r/min,3 min 离心后弃上清液重新悬浮然后分别检测各组处理后 72 h 的 H9C2 心肌细胞凋亡率。上机检测:细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/总细胞数 × 100%。其中核酸染料 PI(propidium iodide,PI)标记坏死的细胞 AnnexinV-FITC 染色阳性,AnnexinV-FITC 标记凋亡与坏死的细胞,PI 染色阴性的细胞为凋亡细胞。

1.7 统计学方法

所有数据使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,实验结果计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本均数比较用单因素方差分析,增殖率采用重复测量方差分析,两两比较采用 Tukey 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 H9C2 心肌细胞 PCR 检测结果显示 ERK1/2 mRNA 的表达

Real-time PCR 结果显示 ERK1/2mRNA 基因表达在 H₂S 组 (1.374 ± 0.270) 心肌细胞与 H/R 组 (0.590 ± 0.046)、H₂S+PD 组 (0.895 ± 0.106) 以及 PD 组 (0.211 ± 0.025) 比较差异有统计学意义 ($F=23.000, P=0.000$); H₂S 组 (1.374 ± 0.270) 大鼠 H9C2 细胞 ERK1/2 mRNA 出现相对明显表达 ($P=0.005$), 而 H₂S+PD 组 (0.895 ± 0.106) 较 H/R 组 (0.590 ± 0.046) 表达明显 ($P=0.027$), PD 组 (0.211 ± 0.025)、Control 组 (0.257 ± 0.104) 相对表达不明显, 缺氧复氧干预后与未干预组相比, 大鼠细胞 ERK1/2 mRNA 表达增加 (图 1、2)。

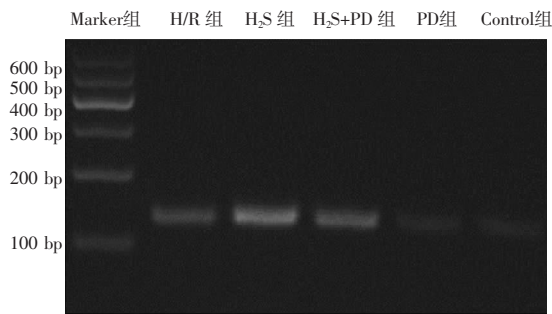


图 1 各组 H9C2 心肌细胞 ERK mRNA 图

Fig.1 ERK mRNA expressions of H9C2 cardiomyocytes in each group

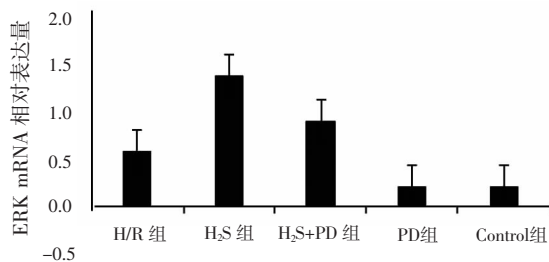


图 2 各组 H9C2 细胞 ERK mRNA 表达直方图

Fig.2 ERK mRNA expressions of H9C2 cardiomyocytes in each group

2.2 Western blot 分析结果显示 H9C2 心肌细胞 ERK1/2 蛋白的表达

Western blot 结果显示 ERK1/2 蛋白表达在 H₂S 组 (ERK1: 1.986 ± 0.184; ERK2: 1.993 ± 0.175) 的心肌细胞与 H/R 组 (ERK1: 1.317 ± 0.179; ERK2: 1.062 ± 0.161)、H₂S+PD 组

(ERK1: 1.615 ± 0.12; ERK2: 1.328 ± 0.047) 以及 PD 组 (ERK1: 0.925 ± 0.42; ERK2: 0.735 ± 0.369) 表达组间差异有统计学意义 ($F_1=5.15, P_1=0.016; F_2=5.44, P_2=0.045$)。H₂S+PD 组较 PD 组、Control 组 (ERK1: 0.874 ± 0.41; ERK2: 0.702 ± 0.258) 表达不明显, 缺氧复氧干预后与未干预组相比, 大鼠 ERK1/2 蛋白表达增加 (图 3、4)。

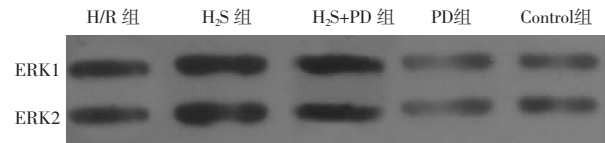


图 3 各组 H9C2 心肌细胞 ERK 蛋白表达图

Fig.3 ERK protein expressions of H9C2 cardiomyocytes in each group

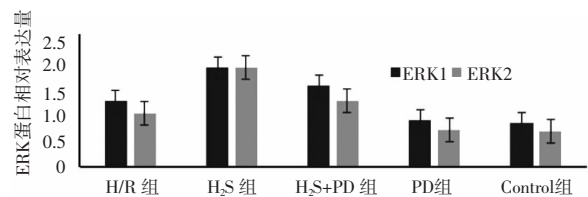


图 4 各组 H9C2 心肌细胞 ERK 蛋白直方图

Fig.4 ERK protein expressions of H9C2 cardiomyocytes in each group

2.3 CCK-8 法检测增殖率

在 CCK-8 法检测结果显示 H₂S 组的心肌细胞较其余缺氧各组增殖率明显增加。其中 Control 组增殖率 (114.0 ± 19.0)%, 缺氧复氧 H₂S 组增殖率 (96.0 ± 13.0)% 较 H/R 组增殖率 (62.0 ± 22.0)%, H₂S+PD 组增殖率 (86.0 ± 17.0)%, PD 组增殖率 (53.0 ± 9.0)% 增加。重复测量方差分析, 结果所示: 不同组别差异有统计学意义 ($F_{group}=84.00, P_{group}=0.000$), 不同时间点心肌细胞增殖率有差异 ($F_{time}=43.67, P_{time}=0.000$), 且组别与时间点间存在交互作用 ($F_{time \times group}=146.31, P_{time \times group}=0.000$)。

表 1 各组 H9C2 心肌细胞增殖率 (%)

Tab.1 ERK proliferation rate of H9C2 cardiomyocytes in each group (%)

组别	2 h	4 h	6 h
H/R 组	0.274	0.283	0.444
H/R+H ₂ S 组	0.333	0.351	0.655
H/R+H ₂ S+PD 组	0.275	0.285	0.514
H/R+PD 组	0.232	0.287	0.356
Control 组	0.408	0.448	0.877

2.4 流式细胞仪检测凋亡率

流式细胞仪检测结果提示: 经缺氧复氧干预后, 抑制剂组 (52.43 ± 6.64)%、H/R 组 (43.59 ± 4.86)%, 细胞凋亡率升高; H₂S 组 (25.00 ± 4.43)% 和 H₂S+PD 组 (34.03 ± 1.78)% 细胞凋亡率降低, 其中 Control 组 (15.37 ± 1.91)% 凋亡率最低, 差异有统计学意义 ($F=22.79, P=0.000$) (图 5、6)。

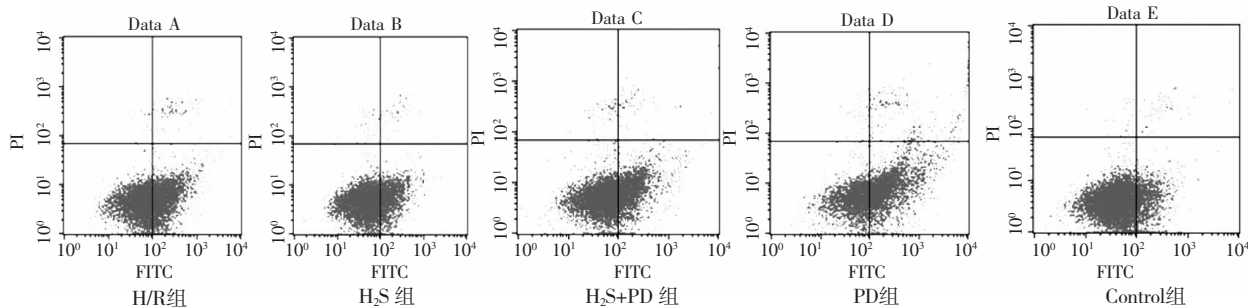


图 5 各组 H9C2 心肌细胞凋亡率

Fig.5 The apoptosis rate of H9C2 cardiomyocytes in each group

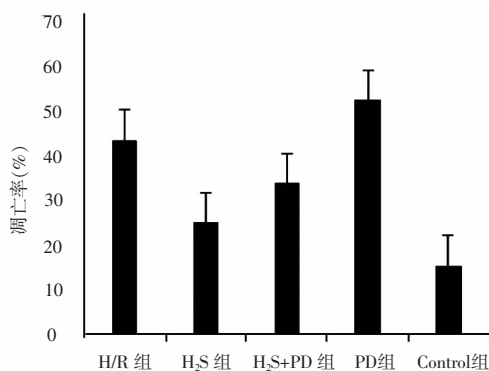


图 6 各组 H9C2 心肌细胞凋亡率

Fig.6 The apoptosis rate of H9C2 cardiomyocytes in each group

3 讨论

心外科手术中心肌缺血再灌注损伤是常见伴随伤害^[6],是指器官在缺血的基础上恢复血流后,器官组织的损伤没有减轻反而加重的现象。最近几年发现 ERK 在心肌细胞缺血再灌注损伤中扮演了重要角色^[7]。同时近年来医学界也逐渐发现硫化氢作为一种强抗氧化剂及血管舒张因子参与机体多种病理生理过程^[8]。但是硫化氢在人体内是通过何种机制产生重要的作用,其机制尚未完全明了,学说众多^[9],而硫化氢后处理方式与 ERK 蛋白表达之间的关系目前国内未见报道。因此本实验通过建立大鼠 H9C2 心肌细胞株缺氧复氧模型,对缺氧复氧心肌细胞添加含有硫化氢信号因子的溶液进行后处理,研究 ERK 表达变化。

本研究选择硫化氢后处理方式对 ERK 蛋白表达是否产生影响作为实验研究基础,采用 real-time PCR 检测 ERK1/2 mRNA,Western blot 法检测心肌细胞蛋白,CCK-8 检测细胞增殖率,流式细胞仪检测凋亡率。观察缺氧复氧 H9C2 细胞在硫化氢后处

理下的变化,探讨 ERK1/2 在硫化氢后处理中的表达及意义。分 5 组其中 H₂S 组作为实验主体,作为探索硫化氢后处理的作用为主要研究对象;H₂S+PD 组确认硫化氢后处理方式所激活的通路;PD 组平衡实验偏性;H/R 组对照 H₂S 组说明硫化氢后处理的具体作用;对照组用于对照说明缺氧复氧模型建立成功。

Real-time PCR 和 Western blot 2 种方法分别从 ERK 基因水平以及 ERK 蛋白水平进行研究。real-time PCR 结果显示在 H₂S 组的心肌细胞 ERK1/2 mRNA 基因表达较 H/R 组、H₂S +PD 组以及 PD 组明显增加;同样 Western blot 结果显示 ERK1/2 蛋白表达在 H₂S 组的心肌细胞较 H/R 组、H₂S+PD 组以及 PD 组增加明显。H₂S 组 ERK1/2mRNA 水平表达比 H/R 组更多,考虑 H₂S 组在硫化氢作用下 ERK 表达产生上调;H₂S+PD 组与 H/R 组在 ERK 表达含量区别相差不明显,可能说明 ERK 通路在其抑制剂的的作用下完全被抑制,H₂S 组的 ERK 表达相较 H₂S+PD 组表达更高,可能证实硫化氢后处理激动的通道与 PD98059 (MAPK 抑制剂)所抑制的通道相同均为 ERK 通路,H₂S 组与 H₂S +PD 组两者含量差距从另一个方面证实了在抑制剂的作用下硫化氢后处理有可能从其他旁路影响 ERK 通路;而 H/R 组比 Control 组表达更多与文献相同表示低氧条件本身就可能激活 ERK 通路^[10]。

CCK-8 法检测结果显示 H₂S 组的心肌细胞相较其余各组增殖率明显增加,其中 H₂S 组增殖率相对最高,PD 组增殖率相对最低,两者表现相反;H₂S+PD 组与 H/R 组在增殖率上表现差距不明显,其可能是因为 H₂S+PD 组抑制剂对 ERK 通路影响导致增殖率增加不明显;由结果可知硫化氢后处理刺激 ERK 表达增加,心肌细胞增殖率增加。

流式细胞仪检测结果提示 H₂S 组的心肌细胞

凋亡率较其余各组明显降低,PD 组相比其余 4 组,完全抑制了其 ERK 通路的作用导致心肌细胞凋亡率高^[11];H₂S+PD 组相比 H₂S 组凋亡率的差距说明两者药物之间对通路作用不同,但两者作用于同一通路即 ERK 通路,同时硫化氢后处理可能通过其他的旁路激活 ERK 通路,PD 组作用明显表明 ERK 蛋白表达含量降低对心肌细胞存活有可能起到反作用^[12]。硫化氢后处理刺激 ERK 蛋白表达增加与心肌细胞凋亡率之间,ERK 蛋白表达越低凋亡率越高^[13]。以上的实验结果均能说明硫化氢后处理方式是通过心肌细胞的 ERK 通路,上调了 ERK 相关基因表达发挥其保护作用^[14]。

本研究发现在缺氧复氧心肌细胞经硫化氢作用后,ERK1/2 mRNA 表达增加增殖率增高,ERK1/2 蛋白表达较少凋亡率较高^[15]。该过程是硫化氢通过与受体结合使胞内受体酪氨酸激酶活化,其中磷酸化部位先与细胞因子受体结合蛋白 2 结合,再与蛋白鸟嘌呤转换因子作用产生 Grb2 复合物,从而激活 Ras 通路。激活的 Ras 通路与丝裂原活化蛋白激酶的激酶结合,激活 MEK 导致 ERK 磷酸化^[16],激活 ERK 通路,使细胞 MAPK 表达增加^[17],加快有丝分裂,减少细胞凋亡^[18]。最终结果诱导细胞外信号进入细胞核,进而调节细胞周期及促进细胞增殖、分化以及细胞死亡相关作用。原因是 ERK 等促细胞存活信号因子,是细胞凋亡信号通路组成部分,受到刺激后,会顺序激活蛋白激酶级联反应^[19],此级联反应通过磷酸化激活 ERK 转导通路而 PD98059 是其相关抑制剂^[20],反之说明硫化氢信号因子作用可能与 PD98059 相反^[21]。同样 ERK 信号通路通过高表达抗凋亡基因激活环氧合酶-2,恢复和稳定细胞能量代谢水平抑制 JNK 和 p38 通路发挥保护的作用^[22];或者硫化氢与心肌细胞之间作用增加了 JNK 的磷酸化进而苏氨酸磷酸化 ERK,并增强与下游效应器的相互作用,从而抑制自噬^[23];又或者 ERK 抵抗内质网应激作用。其结果是硫化氢信号因子后处理促进了 ERK1/2 蛋白的生成保护心肌免受缺氧影响提高存活率,因此可以说硫化氢后处理也同样具有保护心肌细胞抑制心肌细胞凋亡、促进其增殖与存活^[24],改善心肌细胞功能减轻结构破坏^[25]的作用。

本研究结果可能说明通过硫化氢后处理可使 H9C2 心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达,增殖率及生存率增加,凋亡率降低。表明适量硫化氢后处理可促心肌细胞存活,其机制与增加心肌细胞 ERK1/2 的蛋白表达有关。说明有针对性的硫化氢后处理药物有

望发展成为改善心肌缺血再灌注的潜在治疗途径。

参 考 文 献

- [1] Issan Y, Kornowski R, Aravot D, et al. Heme oxygenase-1 induction improves cardiac function following myocardial ischemia by reducing oxidative stress[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92246.
- [2] Chen SL, Yang CT, Yang ZL, et al. Hydrogen sulphide protects H9C2 cells against chemical hypoxia-induced injury[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010(37): 316-321.
- [3] Nicholson CK, Calvert JW. Hydrogen sulfide and ischemia-reperfusion injury[J]. *Pharmacol Res*, 2010(62): 289-297.
- [4] Dong XB, Yang CT, Zheng DD, et al. Inhibition of ROS-activated ERK1/2 pathway contributes to the protection of H₂S against chemical hypoxia-induced injury in H9C2 cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 362(1-2): 149-157.
- [5] Gao Y, Yao X, Zhang Y, et al. The protective role of hydrogen sulfide in myocardial ischemia-reperfusion-induced injury in diabetic rats[J]. *Int J Cardiol*, 2011, 152(2): 177-183.
- [6] Xu W, Wu W, Chen J, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects H9C2 cardiac cells against high glucose-induced injury by inhibiting the activities of the p38 MAPK and ERK1/2 pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(4): 917-925.
- [7] Dong X, Li Z, Wang W, et al. Protective effect of canolol from oxidative stress-induced cell damage in ARPE-19 cells via an ERK mediated antioxidative pathway[J]. *Mol Vis*, 2011(17): 2040-2048.
- [8] Kloesch B, Liszt M, Broell J. H₂S transiently blocks IL-6 expression in rheumatoid arthritic fibroblast-like synoviocytes and deactivates p44/42 mitogen-activated protein kinase[J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34(5): 477-484.
- [9] Di Masi A, Ascenzi P. H₂S: a "double face" molecule in health and disease[J]. *Biofactors*, 2013, 39(2): 186-196.
- [10] Calzia E, Radermacher P, Olson KR. Endogenous H₂S in hemorrhagic shock: innocent bystander or central player? [J]. *Crit Care*, 2012, 16(6): 183.
- [11] Shao JL, Wan XH, Chen Y, et al. H₂S protects hippocampal neurons from anoxia-reoxygenation through cAMP-mediated PI3K/Akt/p70S6K cell-survival signaling pathways[J]. *J Mol Neurosci*, 2011, 43(3): 453-460.
- [12] Du R, Wu T, Liu W, et al. Role of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in driving tricalcium silicate-induced proliferation and biomineralization of human dental pulp cells in vitro[J]. *J Endod*, 2013, 39(8): 1023-1029.
- [13] Cai C, Teng L, Vu D, et al. The heme oxygenase 1 inducer (CoPP) protects human cardiac stem cells against apoptosis through activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK)/NRF2 signaling pathway and cytokine release[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(40): 33720-33732.
- [14] Hussain A, Gharanei AM, Nagra AS, et al. Caspase inhibition via A3 adenosine receptors: a new cardioprotective mechanism against myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2014, 28(1): 19-32.
- [15] Calvert JW, Coetzee WA, Lefer DJ. Novel insights into hydrogen